

## Grado en Biología

### Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Elaboración del proyecto: desarrollo y estudio de modelos animales de artrosis en el pez cebra (*Danio rerio*).**

**Elaboración do proxecto: desarrollo e estudio de modelos animais de artrose no peixe cebra (*Danio rerio*).**

**Grant development: development and study of animal models of osteoarthritis in zebrafish (*Danio rerio*).**



**Uxía Tobío Parada**

Junio, 2021

*Director Académico: Dr. Mónica Folgueira Otero*  
*Director Académico: Dr. M<sup>a</sup> Carmen de Andrés González*

DE ANDRES  
GONZALEZ MARIA  
DEL CARMEN -  
28776647J

Firmado digitalmente  
por DE ANDRES  
GONZALEZ MARIA DEL  
CARMEN - 28776647J  
Fecha: 2021.06.24  
17:25:56 +02'00'

## ÍNDICE

### RESUMEN/ RESUMO

### ABSTRACT

### PALABRAS CLAVE

<b>1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA. ....</b>	<b>4</b>
1.1. LA ARTROSIS (OA) .....	4
1.2. COMPOSICIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR SANO Y ARTRÓSICO .....	4
1.2.1- <i>Condrocitos</i> .....	5
1.3. ESTRUCTURA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR SANO Y ARTRÓSICO .....	5
1.3.1. <i>La matriz extracelular (MEC) del cartílago. Colágenos.</i> .....	7
1.4. MODELOS ANIMALES COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO EN LA OA. EL PEZ CEBRA.....	8
1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. CONTENIDO DEL PROYECTO: INTERÉS PARA EL AVANCE DEL CONOCIMIENTO Y DE LA</b>	
<b>SOCIEDAD. 13</b>	
<b>4. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE LOS RESULTADOS.</b>	<b>14</b>
<b>5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA. ....</b>	<b>15</b>
TAREA 1. IMPORTACIÓN DE LAS LÍNEAS MUTANTES. ....	15
TAREA 2. CRÍA Y MANTENIMIENTO EN EL ANIMALARIO. ....	15
TAREA 3. OBTENCIÓN DE EMBRIONES Y CRÍA. ....	16
TAREA 4. ANÁLISIS DEL MOVIMIENTO DE LA MANDÍBULA.....	16
TAREA 5. FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO. ....	17
TAREA 6. TINCIONES HISTOLÓGICAS .....	17
<i>Safranina- O</i> .....	18
<i>Azul de Alcian y Rojo sirio</i> .....	18
TAREA 7. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA. ....	19
TAREA 8. INMUNOFLOURESCENCIA. ....	23
TAREA 9. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES .....	24
TAREA 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	25
<b>6. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DEL TRABAJO .....</b>	<b>25</b>
<b>7. ESTIMACIÓN ORZAMENTARIA: DESTINO DE LA AYUDA SOLICITADA .....</b>	<b>26</b>
<b>8. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD. ....</b>	<b>27</b>
<b>9. CONCLUSIONES O HECHOS QUE SE PRETENDE ALCANZAR. ....</b>	<b>27</b>
<b>10. CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIEVED .....</b>	<b>28</b>

## RESUMEN/ RESUMO

La artrosis (*osteoarthritis*, OA) se trata de una de las enfermedades crónicas mas frecuentes en la población mundial, afectando a millones de personas. Debido a su importancia, ha sido estudiada y desarrollada en numerosos modelos animales, sobre todo en mamíferos. Sin embargo, existe una enorme oposición pública a la investigación con estos. Por lo tanto, en el actual proyecto se pretende evaluar el desarrollo de OA en el pez cebra (*Danio rerio*), utilizando tres líneas mutantes para genes del colágeno de tipo II (*col2a1*), IX (*col9a1a*) y XI (*col11a2*). Se analizará la amplitud máxima de apertura de la mandíbula y su velocidad, utilizando para ello una cámara de alta velocidad que será colocada en uno de los laterales de la pecera. Por otra parte, mediante tinciones histológicas (safranina- O, azul de alcian y rojo sirio) y técnicas de inmunohistoquímica, se evaluará como afectan las mutaciones en los genes del colágeno a las articulaciones, comparando resultados con la línea *wild type* y modelos mamíferos. Por lo tanto, el presente estudio permitirá caracterizar el grado de alteración de las articulaciones en los individuos mutantes, así como potenciar el uso del pez cebra como modelo para enfermedades articulares.

## ABSTRACT

*Osteoarthritis* (OA) is one of the most common chronic diseases in the world population, affecting millions of people. Due to its importance, it has been studied and developed in numerous animal models, especially in mammals. However, there is enormous public opposition to research with these models. Therefore, the current project is intended to evaluate the development of OA in zebrafish (*Danio rerio*), using three mutant lines for type II (*col2a1*), IX (*col9a1a*) and XI (*col11a2*) collagen genes. We will analyze the speed and the maximum amplitude of opening of the jaw using a high-speed camera that will be placed on one of the sides of the fish tank. On the other hand, using histological stains (safranin-O, alcian blue and sirius red) and immunohistochemistry techniques, we will evaluate how mutations in collagen genes affect joints, comparing results with the *wild type* line and mammalian models. Therefore, the present study will allow to characterize the degree of joint alteration in mutant individuals, as well as to promote the use of zebrafish as a model for joint diseases.

**PALABRAS CLAVE:** Pez cebra, artrosis, cartílago articular, modelos animales genéticos, colágeno tipo II, colágeno tipo IX, colágeno tipo XI, tinciones histológicas, inmunohistoquímica.

## **1. Contenido del proyecto: estado del arte de la investigación propuesta.**

### **1.1. La artrosis (OA)**

La artrosis (*osteoarthritis*, OA) está considerada como la enfermedad musculoesquelética más común, afectando a millones de personas en el mundo (Teeple *et al.*, 2013). Se trata de una de las principales causas de dolor y discapacidad en la población adulta (Loeser *et al.*, 2013); ya que a nivel mundial afecta al 9,6% de los hombres y al 18% de las mujeres que superan los 60 años (Vaca González *et al.*, 2017). Es una enfermedad crónica, por lo tanto, se desarrolla progresivamente durante un largo período de tiempo, produciendo finalmente dolor y pérdida de movimiento (Teeple *et al.*, 2013). Los factores de riesgo más comunes incluyen el sexo, la edad, obesidad, predisposición genética, lesiones, inflamación y la diferenciación del único componente celular del cartílago, los condrocitos (Loeser *et al.*, 2013).

A pesar de la naturaleza multifactorial de la OA, los cambios patológicos observados en las articulaciones que sufren dicha enfermedad poseen una serie de características comunes, que van a afectar a toda la estructura articular. Entre estos cambios se incluyen la degradación del cartílago articular, el engrosamiento del hueso subcondral, la formación de osteofitos (protuberancias óseas presentes en las superficies articulares), diferentes grados de inflamación del tejido sinovial y degeneración de ligamentos. Además de todos éstos, también pueden tener lugar cambios en los músculos periarticulares, es decir, en aquellos músculos que se encuentran rodeando a las articulaciones (Loeser *et al.*, 2013).

### **1.2. Composición del cartílago articular sano y artrósico**

El cartílago articular es un cartílago hialino cuya integridad es fundamental para la salud las articulaciones y que se encuentra alterado en todas aquellas articulaciones que sufren OA. Se trata de tejido conectivo altamente especializado que se localiza en las articulaciones diartrodiales (articulaciones formadas por cartílago y que están unidas por la cápsula sinovial o articular, en la cual se encuentra el líquido sinovial que las protege) (Fox *et al.*, 2009). Tiene como función principal proporcionar una superficie lisa y lubricada para la articulación, además de

facilitar la transmisión de cargas con baja fricción articular (Loeser *et al.*, 2013). Se caracteriza por su carencia de innervación, vasos sanguíneos y linfáticos, así como la abundancia de células muy especializadas denominadas condrocitos inmersos en una matriz extracelular (MEC) muy abundante.

### **1.2.1- Condrocitos**

Los condrocitos representan aproximadamente un 2% del volumen del cartílago articular y presentan numerosas variaciones en cuanto a forma, número y tamaño, según la zona del cartílago articular en la que se encuentren y el estado del cartílago. Desde el punto de vista del desarrollo y diferenciación, estas células se originan a partir de células madre mesenquimales (Fox *et al.*, 2009). Los condrocitos presentan un importante papel en el desarrollo, mantenimiento y reparación de la MEC (Fox *et al.*, 2009), aunque actualmente no se conoce del todo cómo lo hacen, debido a que prácticamente no se dividen al estar inactivos en el cartílago sano (Goldring *et al.*, 2009). Estas células presentan una limitación importante, ya que tienen un potencial de replicación muy bajo, lo que implica que la capacidad de reparación del cartílago tras sufrir alguna lesión sea muy reducida (Fox *et al.*, 2009). En la OA, los condrocitos se convierten en células activas, comienzan a proliferar, agruparse y a producir proteínas y enzimas, que degradan la matriz. Por lo que los condrocitos provocan cambios en la matriz y la estructura del cartílago articular, apareciendo hipertrofia y cartílago calcificado (Loeser *et al.*, 2013).

### **1.3. Estructura del cartílago articular sano y artrósico**

El cartílago articular presenta una estructura altamente organizada que se compone de cuatro regiones distintas que, de regiones superficiales a profundas, son: (1) la zona superficial o tangencial, (2) la zona media (zona de transición), (3) la zona profunda y (4) la zona calcificada (Fox *et al.*, 2009) (**Figura 1**).

(1) **Zona superficial o tangencial:** constituye aproximadamente entre el 10 y el 20% del espesor total del cartílago articular. Se encarga de proteger a las capas más profundas de las tensiones de cizallamiento. Está formada por delgadas fibrillas de colágeno (especialmente colágenos tipo II y IX) que se disponen de manera tangencial. Esta capa superficial presenta numerosos condrocitos y está en

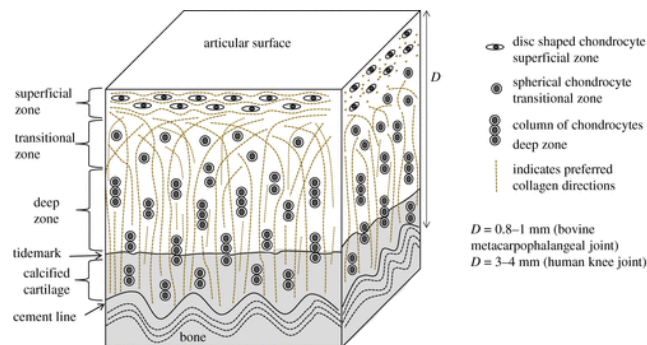
contacto con el líquido sinovial, siendo responsable de muchas de las propiedades de tracción del cartílago.

(2) **Zona media:** representa del 40 al 60% del volumen total del cartílago, proporcionando una zona de transición entre la zona superficial y la zona profunda. En esta capa podemos encontrar proteoglicanos y fibrillas de colágeno más gruesas organizadas de forma oblicua. Los condrocitos están presentes en bajas densidades.

(3) **Zona profunda:** ocupa el 30% del volumen total y se encarga de proporcionar la mayor resistencia frente a las fuerzas compresivas, lo que se debe a la disposición perpendicular de las fibrillas de colágeno. Esta zona presenta el mayor contenido de proteoglicanos y los condrocitos aparecen dispuestos en una orientación columnar, paralelos a las fibrillas de colágeno.

(4) **Zona calcificada:** presenta un importante papel en la fijación del cartílago al hueso, anclando las fibrillas de colágeno de la zona profunda en el hueso subcondral. En esta capa, los condrocitos son escasos y sufren hipertrofia.

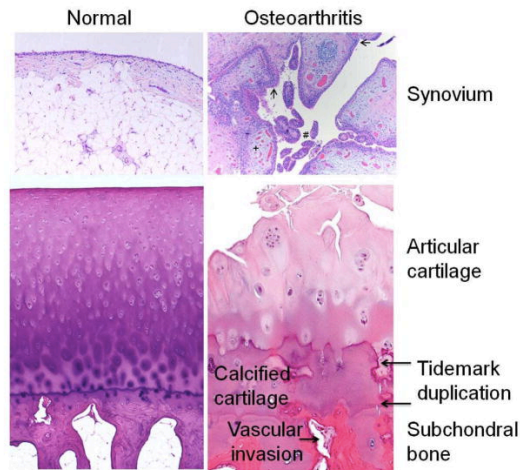
Finalmente, entre el cartílago y el hueso subyacente tenemos una región intermedia, también denominada *tidemark* (Fox *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Estructura del cartílago articular sano. (Imagen de: Mansfield *et al.*, 2019).

La membrana sinovial se trata de una capa de tejido conjuntivo que recubre las cavidades de las articulaciones. En la OA, muestra hiperplasia, mientras que en las articulaciones sanas se trata de una capa fina de 1 o 2 células de grosor (**Figura 2**). En la OA también se puede apreciar una disminución de células en el cartílago articular y un engrosamiento de la zona calcificada, además de una duplicación de la marca de agua o *tidemark*. El hueso subcondral también va a aparecer

engrosado. Por último, se observa una invasión vascular, que se puede extender hacia la base del cartílago articular a través de la *tidemark* (Loeser *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Comparación de la estructura del cartílago articular y del tejido sinovial sano (izquierda) y con OA (derecha). (Imagen de: Loser *et al.*, 2013).

### 1.3.1. La matriz extracelular (MEC) del cartílago. Colágenos.

El 95% del volumen del cartílago articular está ocupado por la MEC, que contiene aproximadamente entre un 60 y un 80% de agua. Además, está formada por un 15% de colágenos de diferentes tipos y por un 9% de proteoglicanos. Estos datos son valores aproximados, ya que la cantidad de colágeno y de proteoglicanos varía en función de la zona en la que se encuentren dentro del tejido (Vaca González *et al.*, 2017). A pesar de las variaciones, las proteínas más abundantes en la MEC son los colágenos, que representan 2 tercios del total del cartílago adulto. Se han encontrado numerosos tipos de colágeno en el cartílago articular, como el tipo II, IX, X, XI, VI, XII y XIV (Luo *et al.*, 2017). También aparecen proteínas no colágenas (ancorina, fibroactina y la proteína oligomérica de la matriz del cartílago), glicoproteínas y lípidos, pero en cantidades menores, ocupando menos del 1% (Thonar *et al.*, 1999).

En este proyecto, nos centraremos en el estudio del papel de los colágenos II, IX y XI en el mantenimiento de la integridad de la estructura de la articulación.

- El **colágeno de tipo II** es el componente mayoritario de la MEC, y constituye un 80% de todos los colágenos presentes en el cartílago articular adulto (Vaca González *et al.*, 2017). La estabilidad del colágeno de tipo II está influenciada por el

colágeno de tipo XI, por lo que se ha visto que la pérdida del gen *Col11a2* en el pez cebra afecta a la distribución del colágeno de tipo II, y la pérdida de éste da como resultado una mayor rigidez de la MEC del cartílago (Lawrence *et al.*, 2018).

- El **colágeno de tipo IX** representa entre un 1 y un 5% del colágeno total presente en el cartílago articular adulto, cuya función es facilitar la interacción de las fibrillas de colágeno con los proteoglicanos (Vaca González *et al.*, 2017). Es fundamental para la integración de la matriz del cartílago, como demuestran ratones con el gen *Col9a1* completamente inactivado, en los que a partir de los 4 meses sufren una enfermedad articular degenerativa que se parece a la OA humana. Por otro lado, las mutaciones en el gen *Col9a2* también se relacionan con un aumento del dolor y una disminución de la movilidad en las articulaciones, pudiendo producir OA. Además, la eliminación del colágeno IX provoca un retraso en la maduración de la matriz del cartílago y una reducida expresión del mismo da lugar a la OA (Luo *et al.*, 2017).

- Por último, **el colágeno de tipo XI** es más abundante que el anterior, constituyendo entre un 3 y un 10% del cartílago articular adulto, y se encarga de regular la producción de colágeno de tipo II. En ratones con colágeno tipo XI mutado, se observa la aparición de ciertas enfermedades, como la OA, que también aparece en aquellos ratones que carecen de este tipo de colágeno. También se demostró que las mutaciones en ratón en *Col11a1* y *Col11a2* dan como resultado OA (Luo *et al.*, 2017).

#### **1.4. Modelos animales como herramienta de estudio en la OA. El pez cebra.**

En la actualidad, las estrategias terapéuticas utilizadas frente a la OA buscan disminuir el dolor y aumentar la movilidad. Sin embargo, ninguna de ellas frena el avance de la enfermedad o regenera el cartílago dañado. Por esta razón, es necesario desarrollar nuevos tratamientos, para lo que es fundamental utilizar modelos animales que recapitulan las características de la enfermedad en humanos (Lorenz *et al.*, 2014).

Hasta el momento, existen tres tipos principales de modelos animales de OA (Teeple *et al.*, 2013):

**(1) Modelos genéticos:** incluye a los animales modificados genéticamente. Estos modelos son ampliamente utilizados para estudiar la función de un determinado gen y su interacción con los componentes del tejido. Se caracterizan



por una progresión lenta, por lo tanto, requieren de mucho tiempo para que se produzca la alteración de la articulación (Lampropoulou- Adamidou *et al.*, 2014).

**(2) Modelos de inducción quirúrgica:** el inicio o la aceleración de la degeneración articular se realiza utilizando cirugía. Dentro los modelos de inducción quirúrgica se incluyen diferentes técnicas, como meniscectomía (cirugía del menisco), transección del ligamento cruzado anterior y osteotomía (cirugía del hueso). Las articulaciones de la rodilla se utilizan frecuentemente en estos modelos quirúrgicos de OA en animales. Una de las técnicas más empleadas es la sección del ligamento cruzado anterior, que se puede realizar al mismo tiempo que una meniscectomía, consiguiendo acelerar progresión del daño articular y de la OA (Teeple *et al.*, 2013).

**(3) Modelos generados mediante métodos de inyección:** en este caso se realiza la inyección controlada de sustancias condrotóxicas o proinflamatorias en las articulaciones (Teeple *et al.*, 2013). Los modelos de inyección consisten en estimular la inflamación del tejido articular, el daño directo de la matriz o la toxicidad en los condrocitos. Son muy eficaces para estudiar la degeneración de la matriz, pero como resultado pueden provocar la muerte masiva de los condrocitos, que no se incluye en la progresión de la OA espontánea (Teeple *et al.*, 2013). Un ejemplo de OA inducida por sustancias químicas es la inyección de colagenasa intraarticular en la articulación de la rodilla, ya que esta provoca la debilitación de los ligamentos, causando inestabilidad y desarrollando OA en 6 semanas (Lorenz *et al.*, 2014).

Como alternativa a la utilización de modelos animales mamíferos, en este proyecto utilizaremos el pez cebra (*Danio rerio*), un pequeño ciprínido dulceacuícola y de aguas tropicales originario del sur de Asia. Hoy en día es uno de los modelos más utilizados junto a *Drosophila sp.*, *Caenorhabditis elegans* y algunos vertebrados, como puede ser el ratón. El interés por utilizar el pez cebra se debe a que su patrón de desarrollo es similar al de los vertebrados superiores, incluidos los mamíferos (Rocha *et al.*, 2001). Además, en términos evolutivos, es mucho más próximo que los invertebrados, como *Drosophila sp.* y *Caenorhabditis elegans*. Por otro lado, tiene ciertas ventajas sobre otros modelos, como puede ser su pequeño tamaño, lo que permite mantener un elevado número de ejemplares en un espacio reducido (**Tabla I**). Otra característica ventajosa es que una sola hembra es capaz de poner cientos de huevos por semana y además son fértiles todo el año, lo que proporciona una gran capacidad reproductora. El tiempo de desarrollo del embrión

es corto y pueden alcanzar la madurez sexual solamente en 3 ó 4 meses. Además de todas estas características, su obtención y mantenimiento en el laboratorio es más económico que el de muchos otros organismos modelo, como por ejemplo los mamíferos (Moreno Fernández, 2013). Por ultimo, otra ventaja muy importante es que actualmente existen un mayor numero de líneas modificadas genéticamente que en el caso de mamíferos (Rocha *et al.*, 2001). Todas ellas se mantienen en laboratorios de investigación o centros stock (European Zebrafish Resource Center; <http://www.ezrc.kit.edu>) y toda la información acerca de ellos está disponible en la base de datos ZFIN (<http://zfin.org/>). Desde el punto de vista de regulación o legislación, es igual trabajar con un pez o con mamíferos, como puede ser un ratón. A pesar de esto, es cierto que hay menos oposición pública hacia la experimentación con peces.

**Tabla I.** Características del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para investigaciones (Imagen de: Rocha et al., 2001).

Conceptos	Valores
Mantenimiento	bajo coste
Espacio	pequeño: 30 animales/20 L
Maduración sexual	a los 4 meses después de la eclosión
Reproducción	controlable por alimentación y luz
Descendencia	200-400 huevos/hembra/2 semanas
Desarrollo embrionario	documentado a nivel genético
Tiempo desarrollo embrión	3-4 días
Características embriones	transparentes
Alimentación	seco y vivo
Stock de mutantes	actualmente miles

A pesar de ser ampliamente utilizado en diversos campos de la biología, el pez cebra apenas formó parte de estudios de enfermedades articulares porque se pensaba que carecían de articulaciones sinoviales lubricadas. Askary y colaboradores (2016) demostraron que sí poseen este tipo de articulaciones, presentando la articulación de la mandíbula y de las aletas importantes similitudes con humanos. Entre otras, estas articulaciones en el pez cebra producen la proteína lubricina, que lubrica las articulaciones también en ratones y humanos (Askary *et al.*, 2016).

El pez cebra tiene una enorme capacidad de regeneración de estructuras esqueléticas, incluidas las aletas, el techo del cráneo y la mandíbula. Esta elevada

capacidad de regeneración se demostró en un estudio de Ohgo y colaboradores (2019), en el que realizaron una amputación de la mandíbula, observándose, como resultado, la regeneración del cartílago (Ohgo *et al.*, 2019). Por tanto, no parece adecuado para realizar modelos quirúrgicos de OA, a pesar de que son los más utilizados en los mamíferos. Por esta razón, en este proyecto nos centraremos en la utilización de modelos genéticos de pez cebra, empleando tres líneas mutantes para los genes del colágeno II, XI y XI.

Las líneas mutantes empleadas en el actual proyecto serán: **sa21270** (mutante utilizado para el gen *col2a1*), **sa15187** (mutante utilizado para el gen *col9a1a*) y **sa17390** (mutante del gen *col11a2*).

### 1.5. Referencias bibliográficas:

Askary et al. (2016). Ancient origin of lubricated joints in bony vertebrates. *eLIFE*.

Fox, A.J.S. et al. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 6: 461-468.

Goldring, M.B. & Marcu, K.B. (2009). Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 3.

Jairo Vaca-González, J. et al. (2017). Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de conceptos actuales. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, 4: 202-210.

Lampropoulou- Adamidou, K. et al. (2014). Useful animal models for the serearch of osteoarthritis. *Eur J Ortohop Surg Traumatol*, 24: 263-271.

Lawrence, E.A. et al. (2018). The mechanical impact of *col11a2* loss on joints; *col11a2* mutant zebrafish show changes to joint development and function, which leads to early-onset osteoarthritis. *Philosophical Transactions B*, 373.

Loeser, R. F. et al. (2013). Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum*, 6: 1697–1707.

- Lorenz, J. & Grässel, S. (2014). Experimental Osteoarthritis Models in Mice. *Mouse Genetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*.
- Luo, Y. et al. (2017). The minor collagens in articular cartilage. *Protein & Cell*, 8: 560–572
- Mansfiel, J. C. et al. (2019). Collagen reorganization in cartilage under strain probed by polarization sensitive second harmonic generation microscopy. *Journal of The Royal Society Interface*, 16.
- Moreno Fernández, M. (2013). Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*). Universidad del País Vasco, Leioa.
- Ohgo, S. et al. (2019). Tissue regeneration during lower jaw restoration in zebrafish shows some features of epimorphic regeneration. *Development, Growth & Differentiation*, 7-8: 419-430.
- Pritzker, K.P.H. et al. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Research Society International*, 14: 13-29.
- Rocha A. et al. (2001). Biología molecular de los peces: Interés y Aplicaciones. *Revista AquaTIC*, 15: 1-9.
- Teeple, E. et al. (2013). Animal models of osteoarthritis: challenges of model selection and analysis. *The AAPS Journal*; 2
- Thonar, E.J. et al. (1999). Structure and function of normal human articular cartilage. *Osteoarthritis, clinical and experimental aspects*, 1-19.

## **2. Justificación y objetivos**

La OA es la enfermedad musculoesquelética más común. Ha sido estudiada en diferentes especies, sobre todo en mamíferos, y los modelos más abundantes en los animales son los quirúrgicos. El pez cebra está considerado como uno de los

organismos modelo más importantes, pero apenas se ha utilizado para el estudio de enfermedades de la articulación. Por lo tanto, en el presente proyecto, se llevará a cabo el desarrollo y el estudio de la OA en el pez cebra. Esta especie presenta una gran capacidad de regeneración, imposibilitando los modelos quirúrgicos. Debido a esto, se ha considerado más apropiada la utilización de modelos genéticos. Así, este proyecto de investigación presenta los siguientes objetivos:

1. Caracterización del estado de las articulaciones y la composición del cartílago articular en los mutantes del pez cebra mediante las tinciones Safranina-O, azul de alcian y rojo sirio.
2. Caracterización del fenotipo en líneas que portan alelos mutantes para los colágenos tipo II (*col2a1*), IX (*col9a1a*) y XI (*col11a2*) mediante el empleo de técnicas de inmunofluorescencia y técnicas de imagen *in vivo* de alta resolución.
3. Comparación de los resultados con la línea salvaje de pez cebra, observando así las diferencias provocadas por la alteración de los genes del colágeno II, IX y XI.
4. Comparación de los resultados con modelos de OA en mamíferos para determinar en que grado el pez cebra es un modelo adecuado.

### **3. Contenido del proyecto: interés para el avance del conocimiento y de la sociedad.**

En la actualidad, la OA afecta a una gran parte de la población, por lo tanto, está considerada como la enfermedad musculoesquelética más común. En los mamíferos ha sido ampliamente estudiada, pero sin embargo, en un organismo modelo tan importante como el pez cebra aún no existen prácticamente estudios de dicha enfermedad. Por lo tanto, el actual proyecto va a permitir descubrir si el pez cebra puede desarrollar OA, potenciándolo como organismo modelo para el estudio y del desarrollo de enfermedades de la articulación. De esta manera, se permitirá un estudio más detallado de la enfermedad y una visión más amplia en las distintas especies.

Por otra parte, el conocimiento de las articulaciones y de la composición del cartílago articular en esta especie, puede ser interesante para el estudio del desarrollo de otras muchas enfermedades, como el síndrome de Weissenbacher-

Zymuller (asociado con mutaciones en los genes que codifican los colágenos de tipo XI) (Lawrence et al., 2018).

En definitiva, este proyecto será de gran interés en estudios del desarrollo del sistema esquelético del pez cebra y en los estudios de la OA. También puede ser realmente interesante para aquellos que investigan o tratan de encontrar tratamientos para la OA en humanos. Una posibilidad a la hora de buscar nuevos tratamientos sería la utilización del modelo de OA para testar fármacos y nutraceuticos. Esto es posible debido a que el pez cebra presenta un patrón de desarrollo similar a los vertebrados superiores, además de poseer articulaciones sinoviales como en el caso de los humanos.

#### **4. Contenido del proyecto: plan de difusión y explotación de los resultados.**

Este proyecto es de especial interés para los grupos de investigación que se dedican al estudio del desarrollo del sistema esquelético del pez cebra y, también para aquellos que se basan en el estudio de la OA, tratando de buscar nuevas soluciones para dicha enfermedad.

En el laboratorio se contará con la presencia de un estudiante de doctorado, el cuál realizará este estudio como su tesis doctoral, siendo esta una importante vía de difusión. Además, parte de la caracterización de los mutantes podría ser realizada en un trabajo de fin de grado, que también se trataría de otra vía de difusión.

Los resultados obtenidos serán publicados en revistas indexadas, las cuáles serán seleccionadas según su impacto en el *Journal Citation Report*. Es importante mencionar que serán primadas aquellas publicaciones que permitan el acceso gratuito sin la necesidad de pagar o de suscribirse. Se participará también en congresos y conferencias.

Por último, otra vía de difusión de los resultados será mediante charlas de divulgación científica en la propia universidad o bien en la Feria de la Ciencia en la Calle. En este último caso, sería de vital importancia elaborar algún tipo de apoyo gráfico, como posters o presentaciones de tipo divulgativo, resumiendo los resultados de una manera llamativa y atrayente.

## 5. Viabilidad del proyecto: metodología.

### Tarea 1. Importación de las líneas mutantes.

Para el desarrollo del proyecto serán utilizadas líneas de peces cebras mutados en genes para el colágeno II (*col2a1*), IX (*col9a1a*) y XI (*col11a2*). Estos mutantes no serán creados en el laboratorio del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), sino que se importarán como embriones desde el Centro Europeo de Recursos para el Pez cebra (European Zebrafish Resource Center- EZRC), que mantiene y distribuye una enorme cantidad de líneas mutantes y transgénicas de dicho pez. La elección de este centro se debe a que al situarse en Europa (Alemania), el envío será mucho más fácil y menos problemático que en el caso de otros centros situados, por ejemplo, en Estados Unidos. Las líneas mutantes empleadas serán: (1) **sa21270** (mutante para el gen *col2a1*) contiene mutación puntual con variación en el sitio de empalme; (2) **sa15187** (mutante para el gen *col9a1a*) contiene una mutación puntual con una parada prematura; (3) **sa17390** (mutante para el gen *col11a2*) contiene una parada prematura. Además, también se utilizarán peces *wild type* (tipo silvestre) de la línea Tüpfel long fin (TL) que ya existe en el animalario del CICA.

### Tarea 2. Cría y mantenimiento en el animalario.

Una vez que los embriones provenientes del EZRC lleguen al CICA, serán alimentados durante un período de 2 o 3 meses hasta que alcancen su madurez sexual, produciendo descendencia, la cuál será utilizada para el desarrollo del proyecto. Estos peces son la segunda generación (F2), ya que la primera generación (F1) será la que permanece en el EZRC. Este mismo procedimiento se llevará a cabo con la descendencia de generaciones sucesivas que se utilizarán en el proyecto.

Los peces se mantendrán en un sistema comercial de acuarios (Aquaneering), que cuenta con mecanismos de recirculación del agua. El pez cebra tiene un rango de tolerancia térmica muy amplio, pero la temperatura recomendada para su mantenimiento en el laboratorio es de 28°C (Aleström et al., 2019). Además, estarán sometidos a un ciclo de luz-oscuridad de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Se mantendrá el agua dentro de los parámetros recomendados de nitritos, nitratos y amonio (Aleström et al., 2019), para lo que se realizarán test semanales con kits comerciales.

En cuanto a su alimentación, los peces cebras son generalistas y consumen una amplia variedad de crustáceos, tanto bentónicos como planctónicos, además de gusanos y larvas de insectos (Lawrence, 2007). Por lo tanto, su alimentación en el laboratorio será llevada a cabo 2 veces al día mediante comida seca y larvas de *Artemia salina* (crustáceo).

### **Tarea 3. Obtención de embriones y cría.**

Una vez que los peces hayan crecido y alcanzado su madurez sexual, se llevará a cabo el cruce entre individuos adultos de la F2. En la naturaleza, los peces cebras se reproducen siguiendo un proceso estacional, pero en el laboratorio puede ocurrir durante todo el año (Spence et al., 2008), por lo tanto, no sería necesario esperar a una determinada época. Para llevar a cabo el proceso, un macho y una hembra serán trasladados a una nueva pecera (tanque de cría) para que tenga lugar la reproducción, la cual está muy relacionada con el fotoperiodo. Las hembras desovarán al amanecer, dentro de las primeras horas de luz del día (Lawrence, 2007), por lo tanto, la mudanza al tanque de cría tendrá lugar por la tarde. De esta manera, cuando se encienda la luz a la mañana siguiente, las hembras llevarán a cabo la puesta de los huevos. Los huevos serán recogidos el día de la puesta y se pasarán a unas placas Petri, las cuales se incubarán en la estufa. La eclosión de las larvas, a una temperatura de 28 °C, tendrá lugar entre 2,5 y 3 días después de la fertilización (Lawrence, 2007).

### **Tarea 4. Análisis del movimiento de la mandíbula.**

Se llevará a cabo el análisis de la amplitud máxima de apertura de la mandíbula y de su velocidad. Se realizará tanto en los individuos mutantes como en la línea *wild type*, para así contrastar los resultados y observar como las mutaciones afectan a la movilidad mandibular. Como se trata de individuos adultos, cada uno se pasará a una nueva pecera, en la que en la parte lateral estará colocada una cámara de alta resolución que grabará mientras los individuos se alimentan. Posteriormente, se realizará el análisis de la película, para lo que se empleará un programa de análisis de imagen. En este caso, se utilizará ImageJ. Debido a que los peces están en continuo movimiento, serán seleccionados los fragmentos en los que el animal se encuentre en posición lateral para así poder observar bien la mandíbula.



### **Tarea 5. Fijación y procesamiento del tejido.**

El proyecto será realizado con individuos adultos, pero anteriormente será necesario genotiparlos, lo que nos permitirá distinguir los individuos portadores del alelo mutante, sean homocigóticos o heterocigóticos. Cumpliendo las directiva europea (2010/63/UE) y la legislación española (*Real Decreto 53/2013*) vigente en referencia a la investigación con animales, los peces deberán ser eutanasiados antes de fijarlos. La eutanasia se va a producir por sobredosis de anestesia, utilizando metasulfonato de tricaína (Tricaine-S®, Western Chemical Inc.). Posteriormente, se confirmará la muerte mediante la decapitación.

Una vez decapitados, las cabezas serán fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 4 horas a una temperatura de 4°C. En el proyecto, se utilizarán las cabezas de los peces para así observar la mandíbula, por lo tanto, será necesario un paso de descalcificación. Para esto, se empleará EDTA al 20% durante 10 días a temperatura ambiente. Una vez pasados los diez días, el tejido será deshidratado durante 20 minutos mediante lavados con etanol (30, 50, 70, 95 y 100%). El siguiente paso será la inclusión, que se llevará a cabo con parafina a 60°C. Las muestras pasarán por tres baños de parafina líquida, los dos primeros de una hora y el tercero al menos durante 12 horas. Posteriormente, se verterá parafina líquida en un molde, se introducirá la muestra y se colocará según la orientación deseada para la posterior realización del corte. Se dejará solidificar a temperatura ambiente. Por último, se realizarán secciones, para lo que va a ser empleado un micrótopo de rotación realizando cortes de aproximadamente 5 µm.

El protocolo anteriormente descrito será común tanto para la realización de las tinciones histológicas (Safranina-O, azul de alcian y rojo sirio) como para la inmunofluorescencia.

### **Tarea 6. Tinciones histológicas**

La inmensa mayoría de los tejidos animales son incoloros, por lo tanto, para la observación de sus características morfológicas mediante el microscopio óptico es necesario teñirlos. Además, el uso de colorantes permite la tinción de estructuras específicas, como los proteoglicanos, permitiendo así su cuantificación. Primeramente, las secciones de parafina deben ser desparafinadas utilizando xileno. A continuación, las muestras deben ser hidratadas. Para esto, se realizarán

una serie de lavados en etanol de concentración creciente (100, 95, 70, 50 y 30 %) y en agua destilada.

### **Safranina- O**

La safranina- O es una herramienta básica en la identificación de procesos degenerativos, como en este caso, en la OA. Esto es debido a que se va a unir a los grupos carboxilo y a los grupos sulfato (ambos con carga negativa) de los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular del cartílago articular (Aguirre Sánchez, 2012). El protocolo de tinción es el siguiente:

- Teñir las muestras con hematoxina de hierro de Weigert durante 5 minutos.
- Varios lavados de agua destilada.
- Pasar las secciones a una solución de etanol al 70% durante 2 segundos.
- Realizar tres nuevos lavados con agua.
- Teñir las muestras en verde rápido FCF (CAS 2353-45-9; *Santa cruz Biotechnology*) al 0,02% durante 1 minuto y aclarar durante 30 segundos en ácido acético al 1%.
- Teñir en Safranina- O (CAS 477-73-6; *Santa Cruz Biotechnology*) al 1% durante 30 minutos, seguido de tres lavados de 1 minuto en etanol al 95%.
- Lavar los portaobjetos dos veces durante 1 minuto en etanol al 100% y 2 minutos en Hemo-De (NCO174259; *Fisher scientific*), que se trata de un disolvente y agente de limpieza.
- Montar las muestras utilizando Cytoseal.

### **Azul de Alcian y Rojo sirio**

El azul de alcian es muy empleado para la detección de polisacáridos en tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos. También es adecuado para la tinción de membranas basales y cartílago. Por otro lado, el rojo sirio se emplea para la tinción de fibras de colágeno (Megías *et al.*, 2019). En este caso, se utilizará un protocolo combinado de azul alcian y rojo sirio, que es el siguiente:

- Lavar el portaobjetos con la muestra en agua corriente durante 10 minutos.
- Teñir con una mezcla de hematoxilina A y B previamente preparada durante 10 minutos y en condiciones de oscuridad.

- Aclarar con agua corriente 10 minutos.
- Sumergir el portaobjetos 3 o 4 veces en una solución de ácido clorhídrico/alcohol (HCl 1% en etanol 70%).
- Aclarar con agua corriente durante 5-10 minutos.
- Teñir con azul de alcian (A5268, Sigma Aldrich) 10 minutos.
- Aclarar con agua corriente durante 1 minuto.
- Teñir con ácido molibdofosfórico 10 minutos.
- Aclarar en un baño de agua de 1 minuto.
- Teñir con rojo sirio (365548, Sigma Aldrich) durante 45 minutos.

### **Tarea 7. Evaluación histológica.**

En este proyecto, será empleado como método de evaluación histológica el sistema de cartílago osteoartrítico de *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI). Este sistema se basa en la división de la OA en seis grados. El grado se puede definir como la progresión de la OA hacia las capas más profundas del cartílago. A medida que la enfermedad se vuelve más grave, el cartílago profundo se ve más afectado, hasta que este se erosiona por completo y el hueso subyacente se convierte en la superficie articular. Además, también podemos clasificar la gravedad de la OA en estadios, que se define como la progresión horizontal de la enfermedad afectando al cartílago que se encuentre en un mismo compartimento celular, sin tener en cuenta el grado subyacente. Por último, la puntuación será la evaluación final teniendo en cuenta el grado y el estadio (Pritzker *et al.*, 2006).

#### **Grados OA**

Los grados comprendidos del 1 al 4 solamente implican cambios en el cartílago articular. Sin embargo, los grados 5 y 6 ya involucran al hueso subcondral. En cada grado, aparecen establecidas unas características determinadas (**Tabla II**).

El **grado 0** es el cartílago articular hialino sano, y la superficie de este es lisa. La matriz y los condrocitos van a estar organizados en tres zonas claramente diferenciadas y adecuadamente orientadas.

En el **grado 1** se puede observar que la superficie del cartílago permanece intacta. Sin embargo, pueden aparecer unas pequeñas grietas debido a un proceso de abrasión denominado fibrilación superficial. En este grado, también destaca la inflamación de la matriz del cartílago que, en ciertos casos, puede provocar

hipertrofia. Otra característica sería la proliferación de condrocitos en la zona superficial, pudiéndose también observar una muerte de estos. En este grado, la tinción con Safranina 0 puede ser de especial interés, ya que la pérdida de tinción en la matriz va a indicar la degradación de proteoglicanos (Pritzker *et al.*, 2006).

En el **grado 2** ya se observa una discontinuidad en la superficie del cartílago, perdiéndose pequeños fragmentos debido a la abrasión por fuerzas de cizallamiento. Los condrocitos pueden mostrar una expansión y una pérdida de orientación.

En el **grado 3**, las grietas originadas anteriormente pueden extenderse hasta la zona media para dar lugar a unas fisuras verticales. A medida que la OA avanza, estas fisuras pueden ramificarse y extenderse hacia la zona profunda.

En el **grado 4**, la principal característica es la erosión del cartílago. Se pueden observar dos procesos: deslaminación (pérdida de un fragmento de la zona superficial debido a fuerzas cortantes) y, excavación (formación de una cavidad por la pérdida de matriz). La matriz del cartílago puede presentar un aumento en la condensación de colágeno y un incremento en la formación de nuevas fibrillas, especialmente de tipo I. En este grado, también puede apreciarse una formación de quistes en la zona media.

En el **grado 5**, se observa una erosión completa del cartílago hialino no mineralizado. Por lo tanto, la superficie articular es cartílago o hueso mineralizado.

Por último, el **grado 6** se caracteriza por deformación, es decir, va a tener lugar un cambio en la superficie articular. Esto es debido, además de las fracturas de la placa articular, al aumento de la actividad metabólica de la placa ósea articular y a la activación del tejido conectivo que está entre el cartílago y el hueso. En este último grado, el cambio deformativo más temprano consiste en el crecimiento de fibrocartílago sobre la superficie articular anteriormente erosionada (Pritzker *et al.*, 2006).

**Tabla II.** Progresión en profundidad de la OA hacia el cartílago (Adaptación de la tabla de Pritzker *et al.*, 2006)

<b>IMPORTANCIA</b>	<b>CRITERIO</b>
<b>Grado 0: cartílago sano</b>	Matriz: presenta una arquitectura normal Células: intactas y en la orientación apropiada
<b>Grado 1</b>	Matriz: la zona superficial intacta., pero pueden aparecer pequeñas grietas. Inflamación de la matriz. Células: proliferación y muerte.
<b>Grado 2</b>	Discontinuidad en la superficie del cartílago. Condrocitos: expansión y pérdida de orientación.
<b>Grado 3</b>	Fisuras verticales Condrocitos: muerte
<b>Grado 4</b>	Erosión del cartílago. 2 procesos: deslaminación y excavación.
<b>Grado 5</b>	Erosión completa del cartílago
<b>Grado 6</b>	Deformación.

### **Etapas OA**

Dentro de OA, podemos encontrar 4 etapas diferentes (**Tabla III**). Cada una de ellas se diferencia dependiendo de la extensión horizontal de la enfermedad por la superficie del cartílago involucrado, sin tener en cuenta el grado de OA subyacente. En el estadio 1 se representa menos de un 10% de afectación. El siguiente estadio ya corresponde a una afectación entre el 10- 25%. Entre un 25 y un 50% se encuentra en el estadio número 3, y una vez que la afectación representa más de un 50% ya sería el estadio 4 (Pritzker *et al.*, 2006).

**Tabla III.** Progresión horizontal de la OA (Tabla de: Pritzker *et al.*, 2006).

<b>Etapas</b>	<b>% De participación (superficie, área, volumen)</b>
Etapa 0	No se observa actividad de OA
Nivel 1	<10%
Etapa 2	10-25%
Etapa 3	25-50%
Etapa 4	> 50%

### **Puntuación de OA**

El método de puntuación más empleado consiste en un índice que combina los grados y etapas. Se trata de una fórmula muy simple, que se basa en la multiplicación de la etapa por el grado. Por lo tanto, este método permite puntuar la OA en un rango del 0 al 24 (Pritzker *et al.*, 2006) (**Tabla IV**).

**Tabla IV.** Puntuación final de la OA (Tabla de: Pritzker *et al.*, 2006).

<b>Calificación</b>	<b>Etapas</b>			
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>
G1	1	2	3	4
G2	2	4	6	8
G3	3	6	9	12
G4	4	8	12	dieciséis
G5	5	10	15	20
G6	6	12	18	24

## Tarea 8. Inmunofluorescencia.

En el presente proyecto se detectarán tres tipos diferentes de colágeno: (1) **colágeno de tipo II**; (2) **colágeno de tipo IX**; (3): **colágeno de tipo XI**. Se utilizarán anticuerpos originados de animales diferentes para así poder detectar incluso los tres tipos de colágeno en la misma sección. Los anticuerpos utilizados serán monoclonales (el conjunto de anticuerpos usado va a responder únicamente ante un antígeno determinado) o policlonales (la molécula que se quiere detectar puede tener varios puntos que funcionen como antígeno). Los anticuerpos que se van a emplear son comerciales, por lo tanto, serán obtenidos a partir de diferentes proveedores (**Tabla V**).

**Tabla V.** Anticuerpos utilizados a lo largo del proyecto para la inmunofluorescencia.

Tipo de colágeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo Secundario
Tipo II	Anticuerpo policlonal de cabra anti- <i>Col2a1</i> (DPAB1578GB; <i>Creative Diagnostics</i> )	Anticuerpo policlonal de Burro anti-cabra- Alexa Fluor 405 (A48259, <i>Invitrogen</i> )
Tipo IX	Anticuerpo monoclonal de ratón anti- <i>Col9a1a</i> (Sc376969; <i>Santa Cruz Biotechnology</i> )	Anticuerpo policlonal burro anti- ratón- Alexa Fluor 555 (A32773, <i>Invitrogen</i> )
Tipo XI	Anticuerpo policlonal de conejo anti- <i>Col11a2</i> (ABIN634756; <i>Antibodies</i> )	Anticuerpo policlonal burro anti-conejo- Alexa Fluor 488 (A32790, <i>Invitrogen</i> )

Esta técnica será desarrollada con las secciones de parafina obtenidas anteriormente.

- Desparafinar con xileno, rehidratar a través de una serie baños en etanol (100, 95, 70, 50 y 30 %) y en tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M pH 7.4.
- Recuperar el antígeno mediante el uso de tampón de citrato sódico pH 6 en baños a una temperatura de 90 °C durante 35 minutos.
- Incubar las secciones con suero normal de un animal diferente a aquellos de los que se generaron los anticuerpos. En este caso, se empleará suero normal de caballo (R37625; *ThermoFisher*) al 2% en solución salina tamponada con fosfato y detergente Triton X100 (PBST) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Incubar con los anticuerpos. Primeramente, se incubarán con los anticuerpos primarios contra *Col2a1* (anticuerpo policlonal de cabra anti-*Col2a1*), *contra Col9a1* (anticuerpo monoclonal de ratón anti-*Col9a1a*) y *contra Col11a2* (anticuerpo policlonal de conejo anti-*Col11a2*).
- Realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. Una vez realizados los lavados, ya se podrá realizar la incubación de las secciones con los anticuerpos secundarios.
- Lavar 3 veces en PBS para así eliminar el exceso de anticuerpo.
- Por último, montar las preparaciones para el microscopio. En este proyecto, se montarán empleando glicerol al 50% en tampón fosfato 0,1 M pH 7.4.

### **Tarea 9. Procesamiento de las imágenes**

Para visualizar y fotografiar las preparaciones obtenidas con la técnica de inmunofluorescencia será utilizado un microscopio de fluorescencia (Olympus BX63). Para la observación de las muestras preparadas con las diferentes tinciones histológicas se empleará un microscopio de campo claro (Nikon LV150NA).



## Tarea 10. Análisis estadístico.

Se realizará un análisis estadístico con los valores obtenidos anteriormente en los desplazamientos de la mandíbula. En este caso, emplearemos el Software SPSS.

Además, podremos realizar un análisis estadístico con las puntuaciones medias del modelo de evaluación histológica de OARSI. En este caso, se empleará el programa GraphPad Prism 7, con una prueba t de Student para generar los p valores. Los valores de  $P < 0.05$  serán considerados significativos.

## 6. Viabilidad del proyecto: plan del trabajo

Tabla VI. Esquema detallado del pan del trabajo para la realización del proyecto.

Año	2023				2024				2025			
Meses	0-3	3-6	6- 9	9- 12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30	30-33	33-36
Obtención de los embriones mutantes												
Cría y mantenimiento de la F2												
Cruce y puesta de los peces. Cría y mantenimiento de la F3												
Análisis del movimiento de la mandíbula												
Eutanasia y Procesado de las muestras												
Tinción Safranina- O												
Tinción Azul de alcian												
Tinción Rojo Sirio												
Evaluación histológica												
Inmunofluorescencia												
Procesamiento de las imágenes												
Test estadístico y análisis de los resultados												
Difusión de los resultados												

## 7. Estimación orzamentaria: destino de la ayuda solicitada

Tabla VII. Destino de la ayuda.

<b>CONCEPTO</b>		<b>2023</b>	<b>2024</b>	<b>2025</b>
<b>Personal contratado</b> Contrato predoctoral		20.500	20.500	20.500
<b>Equipamiento científico-técnico</b> Micrótopo, congelador, microscopio, etc.		5.500	5.500	-
<b>Material bibliográfico indispensable para la realización del proyecto</b> Acceso a revistas y libros		1.000	1.000	1.000
<b>Material fungible</b>	Dieta de los peces y mantenimiento de los acuarios (luz UV, filtros, etc.)	500	500	-
	Tampones, placas Petri, pipetas, colorantes...	500	1.000	500
	Anticuerpos primarios	-	900	-
	Anticuerpos secundarios	-	900	-
<b>Ayudas de coste por desplazamiento</b> Viajes nacionales y/o internacionales a congresos, conferencias, etc.		-	1.000	1.000
<b>Ayudas para la realización de estadias de investigación (máximo 10% de la cantidad solicitada)</b>		2.000	2.000	3.000
<b>Otros gastos</b> Impresión de poster para divulgación científica y pago por publicación en revistas JCR		-	-	5.000
<b>Importación de los peces de la línea mutante</b>		1.800	-	-
<b>Costes indirectos o gastos generales que reglamentariamente exige la Universidad al grupo solicitantes (máximo 20%).</b>		5.500	5.500	6.500
<b>TOTAL</b>		<b>37.300</b>	<b>38.800</b>	<b>37.500</b>

## **8. Implicaciones éticas y/o de bioseguridad.**

Este proyecto será realizado respetando y siguiendo las leyes españolas referentes a animales de experimentación (Real Decreto 53/2013) y la Directiva Europea 2010/63 para la protección de los animales usados con fines científicos. Así mismo, se eludirá el uso de individuos innecesarios y se tendrá el máximo cuidado, sin causar ningún dolor durante el proceso de eutanasia. Además, se va a seguir el principio de las 3R en experimentación animal. Estas 3R son: reemplazo (métodos que eviten o ayuden a reemplazar el uso de animales); reducción (métodos que ayuden a reducir el número de animales en los experimentos) y refinamiento (métodos que disminuyan o anulen el dolor, mejorando así el bien estar animal).

Por otra parte, todo el personal científico implicado en el desarrollo del proyecto poseerá todos los permisos pertinentes para trabajar con los animales. En el caso de los estudiantes de grado, debido a que no poseen estos títulos, trabajarán siempre bajo la supervisión de alguien que si lo posea.

## **9. Conclusiones o hechos que se pretende alcanzar.**

En el actual proyecto se pretende desarrollar OA en el pez cebra mediante la utilización de modelos genéticos. Sin embargo, en los mamíferos, los modelos más empleados son los quirúrgicos, pero debido a que el pez cebra presenta una elevada capacidad de regeneración, no parece adecuado para la realización de dichos modelos. A pesar de ser un organismo modelo ampliamente usado en diversos campos, apenas se ha empleado en estudios sobre enfermedades articulares. Esto es debido a que la suposición de que los peces con aletas radiadas carecen de articulaciones lubricadas (presentes en humanos) ha obstaculizado su uso para el estudio de estas enfermedades. En base a esto, las conclusiones o hitos que se pretenden alcanzar son la siguientes:

1. Caracterización del grado de alteración de las articulaciones en mutantes de pez cebra para genes de colágeno de tipo II, IX y XI.
2. Determinación de similitudes y diferencias entre las alteraciones articulares en mutantes de colágeno del pez cebra y los modelos de OA en mamíferos.
3. Potenciar del uso del pez cebra como modelo de enfermedades articulares. La opinión pública muestra mucha menos oposición a la

investigación con peces, por lo tanto, se podría incrementar la investigación de la OA con peces en lugar de mamíferos.

#### **10. Conclusions or milestones to be achieved**

The current project aims to develop OA in zebrafish using genetic models. In mammals, the most used models are surgical models, but zebrafish has a high regenerative capacity, so it is not suitable for such approach. Despite being a model organism widely used in various areas of biology, it has hardly been used in studies on joint diseases. This was because it was assumed that fish with radial fins lacked lubricate joints (present in humans), which has hindered its use for studying these diseases. Based on this, the conclusions or milestones to be achieved are as follow:

Characterization of the degree of joint alteration in mutants for type II, IX and XI collagen genes.

Determination of similarities and differences between joint alterations in zebrafish collagen mutants and mammalian OA models.

Promote the use of zebrafish as a model for joint disease. Public opinion show much less opposition to fish research, therefore, OA research with fish rather than mammals should be increased.